

Embryogénèse somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) à partir de tissus foliaires et inflorescenciels. Bilan des recherches et perspectives

J. L. VERDEIL (1), J. BUFFARD-MOREL (1) et C. PANNETIER (2)

Résumé. — Cet article fait le point des travaux réalisés depuis 1982 par l'équipe ORSTOM-IRHO sur l'embryogénèse somatique du cocotier à partir d'explants foliaires et plus récemment (1986), à partir d'explants inflorescenciels. L'obtention régulière de cals sur les deux types d'explants est maîtrisée. Les formations embryogènes néoformées sur cals conduisent, le plus souvent, à une embryogénèse incomplète ou déviée. Les principales formes de déviation et leur voie d'obtention sont décrites en fonction des deux origines tissulaires. Une plantule a été récemment obtenue par embryogénèse somatique à partir d'explant foliaire.

INTRODUCTION

Chez le cocotier (plante pérenne monoïque), les méthodes classiques de sélection se heurtent à un certain nombre de contraintes liées à sa biologie : longueur du cycle de sélection (12 à 16 ans), faible coefficient de multiplication de ce palmier propagé uniquement par graines, forte hétérozygotie de certaines variétés engendrant une grande variabilité au sein des descendance hybrides.

L'obtention de matériel homogène par clonage d'individus hautement producteurs devrait permettre d'augmenter significativement la productivité et l'homogénéité des plantations.

Quelques phénomènes exceptionnels de multiplication végétative spontanée ont parfois été observés : ramifications, formation sur inflorescences de bulbilles [Davis, 1969] qui peuvent parfois s'enraciner [Sudasrip *et al.*, 1978]. Cependant, les techniques horticoles classiques ne sont pas utilisables pour une propagation de routine.

La culture de tissus, très efficace pour le clonage d'un grand nombre d'espèces [Murashige, 1974] parmi lesquelles certaines palmacées dont le palmier dattier [Tisserat *et al.*, 1980] et le palmier à huile [Corley *et al.*, 1977, Rabechault, 1976, Pannetier *et al.*, 1982] représente la seule voie possible pour la multiplication végétative intensive du cocotier.

Depuis plus d'une décennie, des travaux sur l'embryogénèse somatique du cocotier ont été initiés à partir de tissus d'origines diverses. On peut citer sur embryons zygotiques de Guzman *et al.*, 1971, de Guzman, 1978, Noerhadi, 1975, sur racines Fulford *et al.*, 1981 sur explants foliaires Pannetier *et al.*, 1981, Gupta *et al.*, 1984 et sur explants inflorescenciels Eeuwens, 1976, Blake *et al.*, 1982 (Tabl. I).

Les embryons somatiques apparaissent généralement après formation d'un cal obtenu sur l'explant initial (Fig. 1)

Si les premiers résultats furent prometteurs (obtention rapide sur cal de formations de type embryon), trois équipes seulement ont pu, à ce jour, obtenir la régénération complète

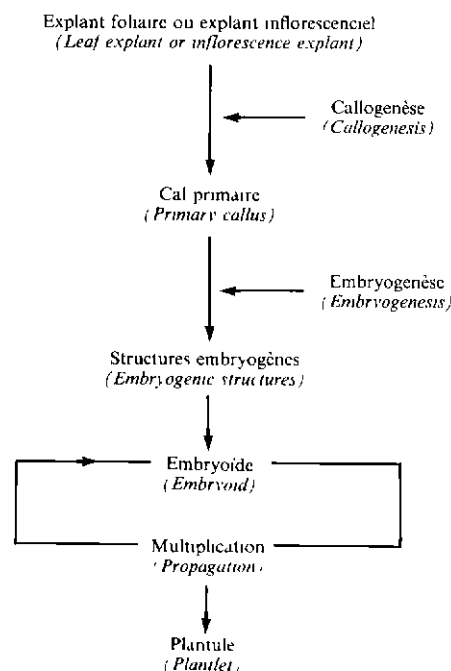


FIG. 1 — Représentation schématique des étapes de l'embryogénèse somatique — (Schematic representation of the different steps in somatic embryogenesis)

de plants à partir de tissus somatiques [Raju *et al.*, 1984 ; Branton *et al.*, 1984, Buffard *et al.*, 1988]. Les vitroplants obtenus l'ont été, semble-t-il, à partir d'un nombre limité de cultures et l'embryogénèse somatique du cocotier demeure à notre connaissance encore mal maîtrisée.

Cet article fait le point des travaux réalisés par l'équipe ORSTOM-IRHO depuis 1981 à partir d'explants foliaires et plus récemment (1986) à partir d'explants inflorescenciels.

Il mentionne les principales difficultés rencontrées et les voies ayant permis l'amélioration de la qualité des cultures d'embryoïdes et l'obtention récente d'une plantule à partir de tissus foliaires.

(1) ORSTOM/IRHO, Laboratoire des ressources génétiques et amélioration des plantes tropicales, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex (France)

(2) Laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire INRA-CNRA, route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex (France)

TABLEAU I. — Micropagation du cocotier : principaux résultats — (*Coconut micropropagation : main results*)

Explant (<i>Explant</i>)	Réponse (<i>Response</i>)	Référence (<i>Reference</i>)
Tissus somatiques (<i>Somatic tissue</i>)		
Explants provenant du stipe (<i>Stem explants</i>)	Prolifération sans sous-culture de cals (<i>Proliferation but no callus subculture</i>)	Apavatjirut and Blake (1977)
Explants racinaires (<i>Root explants</i>)	Formation et sous-culture de cals (<i>Callus formation and subculture</i>)	Fulford <i>et al.</i> (1981)
Explants foliaires (<i>Leaf explants</i>)	Formation de cals et néoformation d'embryoïdes (<i>Callus formation and embryoid neof ormation</i>)	Pannctier and Buffard-Morel (1982a, b)
Explants foliaires à partir de plantules (<i>Leaf explants from plantlets</i>)	Plantules (<i>Plantlets</i>)	Raju <i>et al.</i> 1984)
Explants foliaires (<i>Leaf explants</i>)	Plantules (<i>Plantlets</i>)	Buffard-Morel <i>et al.</i> (1988)
Explants inflorescenciels (<i>Inflorescence explants</i>)	Cals en surface - formation et multiplication de cals par sous-culture (<i>Surface callusing - callus formation and multiplication by subculture</i>)	Eeuwens (1976) Blake and Eeuwens (1982)
Inflorescences immatures (<i>Immature inflorescences</i>)	Plantules (<i>Plantlets</i>)	Branton et Blakel (1984)
Explants provenant de l'endosperme (<i>Endosperm explants</i>)	Formation et sous-culture de cals (<i>Callus formation and subculture</i>)	Fisher and Tsai (1978)
Apex de jeunes plants excisés (<i>Excised seedling apices</i>)	Croissance de l'apex végétatif et formation de plantules (<i>Growth of the vegetative apex and plantlet formation</i>)	Blake and Eeuwens (1982)
Embryons mis en culture <i>in vitro</i> (<i>Embryos cultured in vitro</i>)	Cals - multiplication nodulaire sous forme de protocorme avec quelques feuilles écaillées (<i>Calluses - nodular protocorm-like proliferation with occasional scale leaves</i>)	D'Souza (1982)
Embryons (<i>Embryos</i>)	3 plantules (<i>3 plantlets</i>)	Bhalla-Sarin <i>et al.</i> (1986)
Embryons (<i>Embryos</i>)	Cals, pousses feuillées et racines (<i>Calluses, shoots and roots</i>)	Bhalla-Sarin <i>et al.</i> (1986)
Racines + jeunes inflorescences (<i>Roots + young inflorescences</i>)	Développement de structures de type embryogène (<i>Development embryo like structures</i>)	Branton and Blake (1983)
Inflorescences immatures (<i>Immature inflorescences</i>)	Plantules (<i>Plantlets</i>)	Branton and Blake (1984)
Explants foliaires de jeunes plants (<i>Leaf explants from seedling</i>)	Plantules (<i>Plantlets</i>)	Raju <i>et al.</i> (1984)
Haustorium (<i>Haustorium</i>)	Cals + racines (<i>Calluses + roots</i>)	Jagadcesan and Ladmanabhan (1982)
Embryons (<i>Embryos</i>)	3 plantules (<i>3 plantlets</i>)	Bhalla-Sarin <i>et al.</i> (1986)
Stipes + feuilles + rachilles (<i>Stems + leaves + rachillas</i>)	Régénération de structures embryogènes (<i>Regeneration of embryo like structures</i>)	Gupta <i>et al.</i> (1984)

I. — MATÉRIEL VÉGÉTAL

Les travaux sur l'embryogénèse somatique du cocotier ont été, comme sur le palmier à huile, initiés à partir d'explants foliaires. De façon à diversifier l'origine tissulaire et mieux cerner l'influence de l'état physiologique des explants primaires, un programme de culture de jeunes inflorescences est mené depuis trois ans, parallèlement au programme feuille.

L'essentiel des travaux a porté sur les individus hybrides Nain Jaune Malais × Grand Ouest Africain (hybrides PB 121 créés par l'IRHO). Les génotypes Grand Ouest Africain et Nain Jaune Malais ont également été travaillés.

L'ensemble du matériel végétal provient de la station IRHO Marc Delorme de Côte d'Ivoire.

Pour chaque mise en culture, feuilles et inflorescences sont actuellement prélevées (sur arbres adultes 15-20 ans) en même temps et sur les mêmes individus. Le prélèvement s'effectue sans léser l'apex. La repousse des arbres sélectionnés reste ainsi possible et est effectivement observée.

Pour chaque individu testé, 1 200 à 2 000 explants foliaires et autant d'explants inflorescenciels sont ensemencés.

— Les explants foliaires sont constitués de fragments (longueur 1 cm) de jeunes feuilles non chlorophylliennes entourées des bases pétioles des feuilles plus âgées.

— Les explants inflorescenciels sont représentés par des fragments de rachillae (épaisseur 1 à 1,5 mm) appartenant à de jeunes inflorescences dont la longueur de la spathe interne est comprise entre 10 et 40 cm.

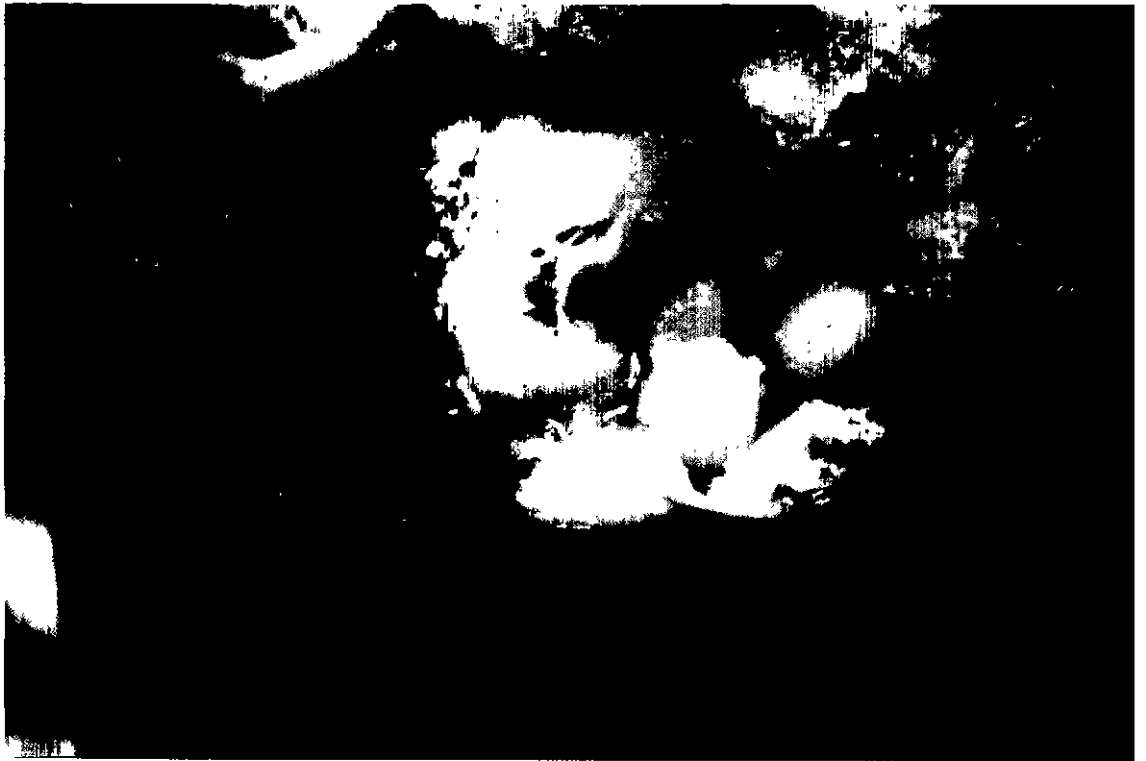
II. — COMPORTEMENT DES EXPLANTS ET INDUCTION DE LA CALLOGÉNÈSE

Les tissus de cocotier présentent une grande sensibilité aux auxines chlorées indispensables à la formation de cals. Cette sensibilité se manifeste par un brunissement intense conduisant à la nécrose des explants aux concentrations auxiniques susceptibles d'induire la formation de tissus néoformés.

Une première étape de recherche, conduite sur explants foliaires de jeunes plants (2 à 5 ans) puis sur arbre adulte, a permis de résoudre le problème de l'obtention de cals par la mise au point de milieux associant charbon actif et auxines.



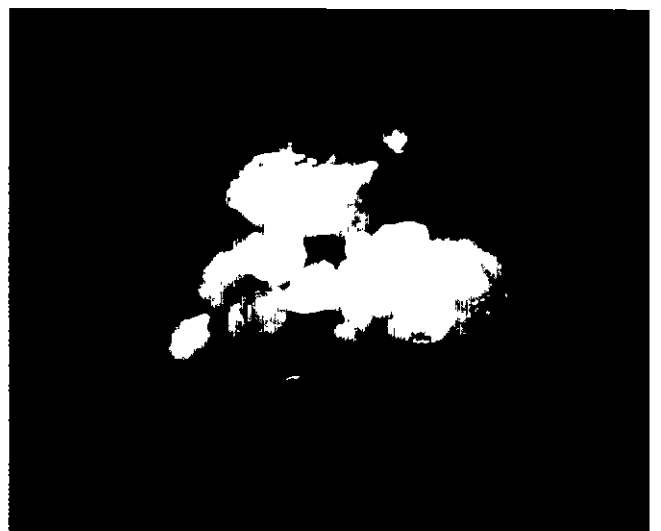
1



2



3



4



5



6



7

L'étude de la composition des milieux auxines-charbon réalisée à partir d'un nombre élevé d'essais a conduit par la suite, à une amélioration de la callogénèse (doublement de son pourcentage) condition nécessaire à la mise en place des essais d'induction de l'embryogénèse.

L'obtention régulière de cals a permis la réalisation d'une description précise de la callogénèse à partir des tissus foliaires et inflorescenciels.

● Sur explants foliaires :

des cals nodulaires sont obtenus sur la face inférieure des feuilles (photo 1), leur délai d'apparition est relativement long (4 à 5 mois sur arbre adulte) ; ils ne sont souvent isolés qu'à partir du sixième mois après la mise en culture. La lenteur des phénomènes qui semble caractéristique des palmacées est probablement accentuée sur le cocotier du fait de l'emploi de charbon actif.

Les études histologiques montrent que la callogénèse est initiée au niveau des cellules périvasculaires des faisceaux conducteurs. Les cals se présentent sous forme de nodules bien individualisés ayant une zone méristématique interne, entourée de cellules parenchymateuses. La localisation interne des cals ainsi que leur mode de croissance qui est assuré par une zone méristématique de type cambium, est également observée sur d'autres palmacées cultivées *in vitro* comme le palmier dattier [Tisserat *et al.*, 1980] et le palmier à huile [Schwendiman *et al.*, 1988].

Le pourcentage de callogénèse varie en fonction de l'âge physiologique de l'explant et de façon significative avec la concentration en auxines du milieu. Il varie également en fonction de l'âge de l'arbre sur lequel est effectué le prélèvement. C'est ainsi que, pour une concentration en auxine pouvant fluctuer sensiblement en fonction de l'époque de prélèvement, le pourcentage d'explants porteurs de cals est de 60 à 70 % sur arbres de 5 ans. Il varie de 30 à 40 % sur arbres de 15 à 20 ans.

● Sur explants inflorescenciels :

suivant la nature et la concentration de l'auxine utilisée, deux types de cals peuvent être formés.

— cals d'origine interne se formant au niveau des tissus vasculaires et apparaissant sur la section du rachis (côté pôle proximal - photo 2), ces cals de forme plus ou moins allongée ont de fortes potentialités racinaires,

— cals blancs globulaires se formant au niveau des territoires floraux et ayant des potentialités embryogènes

(photo 3). Ils apparaissent après 3 à 5 mois de culture sur 45 % des explants pour le meilleur objet. Ils sont semblables aux « calloïds » obtenus par Branton et Blake (1984). Ils dérivent de méristèmes floraux mâles préexistants et sont caractérisés par la présence de plages cellulaires hautement méristématiques.

La réactivité du matériel vis-à-vis de la callogénèse à partir des territoires floraux est, dans nos conditions de culture, étroitement liée à l'âge de l'inflorescence et à son degré de différenciation. Les résultats de ces essais ont permis de retenir, pour les mises en culture ultérieures, les inflorescences dont la spathe externe a une longueur comprise entre 15 et 30 cm.

III. — EXPRESSION DES POTENTIALITÉS EMBRYOGÈNES

Après isolement des cals obtenus sur explants (foliaires et inflorescenciels) des structures de nature embryogène peuvent être obtenues. Elles se présentent sous forme de nodules blanc nacré, plus ou moins individualisés (photo 4). Elles peuvent donner naissance à des globules entièrement méristématiques souvent recouverts d'un épiderme, ils peuvent alors être assimilés à des proembryons.

La totalité des arbres mis en culture a donné naissance à ce type de formations embryogènes dont le rendement reste faible : elles apparaissent au maximum sur 10 % des cals isolés.

Le plus souvent, ces formations sont observées sur cals (d'origine foliaire ou inflorescencielle) par subculture sur des milieux progressivement appauvris en auxines. Sur tissus inflorescenciels, elles peuvent cependant apparaître sans qu'il soit nécessaire de repiquer l'explant d'origine.

L'évolution ultérieure des formations de nature embryogène pose généralement des problèmes. Elles peuvent donner naissance à des structures de type embryon bloqués à ce stade ou bien évoluer suivant deux modalités (Fig. 2) :

— multiplication et obtention d'un massif « d'embryoïdes » soudés dont le développement est stoppé ;

— embryogénèse incomplète caractérisée par le développement de l'haustorium et éventuellement de la racine.

Cependant, récemment, à partir d'explants foliaires, un embryoïde obtenu rapidement après isolement du cal s'est multiplié et a donné naissance au niveau du pôle racinaire à un massif d'embryons somatiques bien individualisés (photo 5). L'un d'entre eux a développé une pousse feuillée

PHOTO 1 — Callogénèse à partir d'explants foliaires prélevés sur arbre adulte : cals nodulaires après environ 80 jours de culture — (*Callogenesis from leaf explants sampled from adult trees : nodular calluses after around 80 days' culturing.*)

PHOTO 2 — Callogénèse à partir d'explants inflorescenciels : cals d'origine interne apparaissant après 40 jours de culture sur la section du rachis et ayant de fortes potentialités racinaires — (*Callogenesis from inflorescence explants : calluses of internal origin appearing after 40 days' culturing on the rachis section, with high rooting potential*)

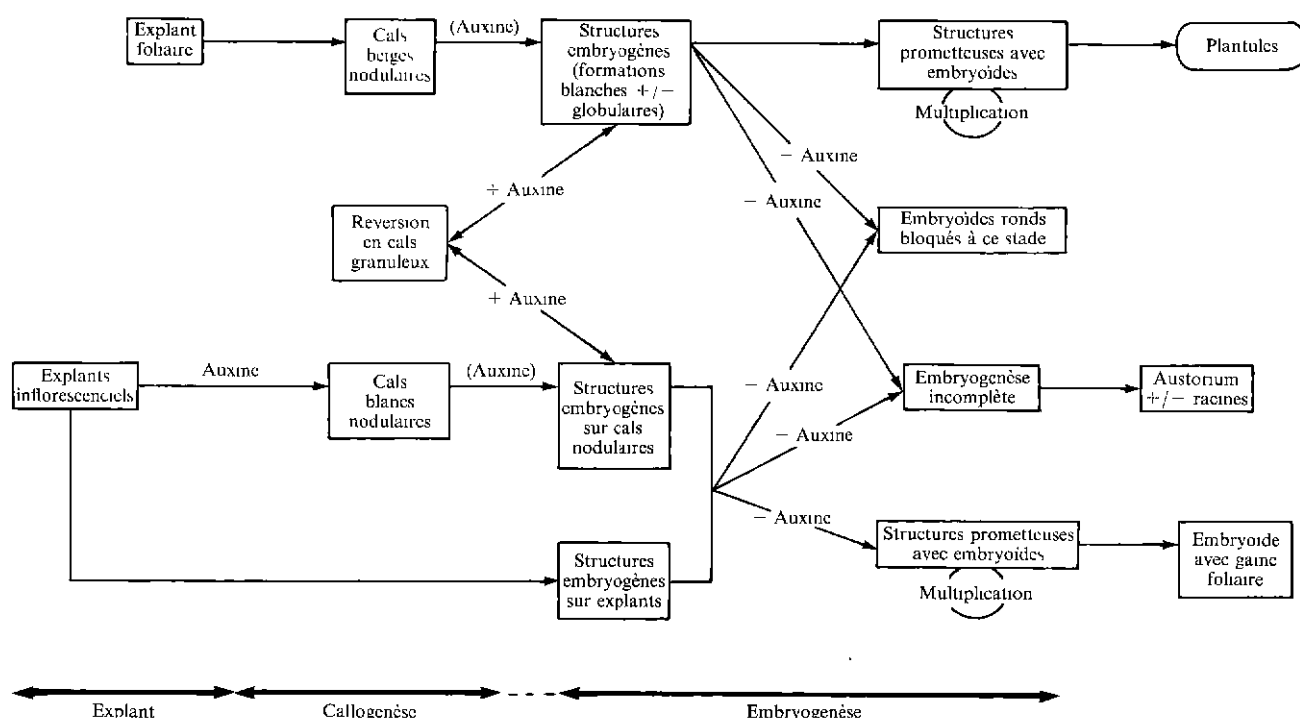
PHOTO 3. — Callogénèse à partir d'explants inflorescenciels : cals blancs globulaires se formant au niveau des territoires floraux et ayant généralement de bonnes potentialités embryogènes — (*Callogenesis from inflorescence explants : globular white calluses forming on the floral areas, generally with good embryogenic potential*)

PHOTO 4 — Type de formations de nature embryogènes obtenus à partir d'explants foliaires ou inflorescences — (*Type of embryo-like formations obtained from leaf and inflorescence explants*).

PHOTO 5. — Massif d'embryoïdes en multiplication obtenu à partir d'explants foliaires prélevés sur arbre adulte — (*Multiplying embryoïd clump obtained from leaf explants sampled from adult tree*).

PHOTO 6. — Plantule obtenue à partir du massif d'embryoïdes ci-dessus (photo n° 5) — (*Plantlet obtained from the above embryoïd clump - photo 5*).

PHOTO 7. — Multiplication d'embryoïdes obtenus à partir d'explants inflorescenciels avec émission d'une gaine foliaire — (*Multiplication of embryoïds obtained from inflorescence explants with leaf sheath emission*).

FIG 2 — Schéma général pour l'obtention et l'évolution des structures embryogènes sur *Cocos nucifera* L.

(photo 6). Après isolement et traitement rhizogène la plantule obtenue vient d'être acclimatée en phytotron avec succès.

D'autre part, sur explants inflorescencielles, un phénomène de prolifération a récemment été obtenu à partir du pôle racinaire de jeunes embryoides isolés très tôt sur un milieu dépourvu d'auxine. Ce phénomène de multiplication a permis l'obtention de cultures prometteuses composées d'« embryons somatiques » dont certains ont émis une gaine foliaire (photo 7).

L'importance d'une possibilité de prolifération à partir du pôle racinaire de jeunes embryoides mérite d'être soulignée :

— c'est à partir de ce type de multiplication qu'a pu être obtenu l'embryon qui a permis la régénération complète d'une plante à partir de tissus foliaires ;

— la multiplication d'embryoides devrait permettre d'assurer la production en masse de vitroplants même si la production de structures embryogènes est au départ limitée.

CONCLUSION

Devant les résultats encourageants obtenus sur tissus foliaires (néoformation d'un plant) et sur tissus inflorescen-

ciels (obtention de cultures d'embryoides en multiplication), les essais sont actuellement poursuivis et intensifiés de façon à aboutir à un véritable procédé de multiplication végétative.

Cette réussite passe par la compréhension des causes de blocage de l'embryogénèse et par une connaissance fine de la physiologie des formations de nature embryogène.

En relation avec l'évolution des tissus, nous poursuivons actuellement des études histochimiques sur la mise en évidence de réserves lipoprotéiques pouvant constituer des marqueurs précoces du bon déroulement de l'embryogénèse [Schwendiman *et al.*, 1988]. Dans la mesure où les hormones exogènes (auxines en particulier) jouent un rôle prépondérant dans l'évolution des structures embryogènes, nous envisageons le dosage *in situ* de ces composés.

La conformité est primordiale dans la mise au point d'une technique de multiplication végétative sur cocotier. La poursuite des recherches sur les deux origines tissulaires (foliaires et inflorescencielles) offre la possibilité d'un choix ultérieur de l'explant, en fonction de la conformité du matériel qui en sera issu. En effet, les cals obtenus à partir des deux types tissulaires sont d'origine et d'aspect différents et l'on sait que le passage par ce stade peut introduire des variations en fonction de la nature du cal.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLAKE J. and EEUWENS C. J. (1982). — Culture of Coconut palm tissues with a view to vegetative propagation, p 145-148. In Rao A N. (Ed) : Tissue Culture for Economically Important Plants. Proc. Intern. Symp. Singapore. Costed, ANBS.
- [2] BRANTON R. L. and BLAKE J. (1984). — Clonal propagation of coconut palm. Int. Comp. on Cocoa and Coconuts.
- [3] BUFFARD-MOREL J., VERDEIL J. L. and PANNETIER C. (1988). — Vegetative propagation of Coconut (*Cocos nucifera* L.) through somatic embryogenesis. Poster in : 8th Int. Biotech. symp. Paris.
- [4] CORLEY R. H. V., BARRETT J. N. and JONES L. H. (1977). — Vegetative propagation of Oil palm via tissue culture. In International Development of Oil palm. Earp D. A. (Ed.), Newall W. (Ed.).
- [5] DAVIS T. A. (1969). — Clonal propagation of the coconut. Wild. Crops. Sept./Oct., p. 253-255.
- [6] DE GUZMAN E. V., DEL ROSARIO A. G. and EUSEBIO E. C. (1971). — The growth and development of Coconut makapuno *in vitro*. III. Resumption of root growth in high sugar media. The Phil. Agric., 53 (10), p. 566-579.

- [7] DE GUZMAN E. V., DEL ROSARIO A. G. and UBALDE E. M. (1978). — Proliferative growth and organogenesis in coconut embryo and Tissue cultures. *The Philippine Journal of Coconut Studies*, 3, p. 1-10.
- [8] EEUWENS C. J. (1976). — Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiol. Plant*, 42, p. 173-178.
- [9] FULFORD R. M., PASSEY A. J. and JUSTIN S. H. G. W. (1981). — Coconut propagation *in vitro*. Rep. E. Malling Res. Stn for 1980.
- [10] GUPTA P. K., KENDURKA S. V., KUIKARNI V. M., SHIR GUKKA M. V. and MASCARENHAS A. F. (1984). — Somatic embryogenesis and plants from zygotic embryos of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 3 (6), p. 22-225.
- [11] MURASHIGE T. (1974). — Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, p. 135-166.
- [12] NOERHADI E., NURITA L. and TORUAN (1975). — Embryo development and the growth of growing tissues of coconut seedlings *in vitro*. FAO consultation: problems in palm tree breeding Rome 29 Sept./1^{er} Oct.
- [13] PANNETIER C., ARTHUIS P. and LIEVOUX D. (1981). — Néofor-mation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro* (Trilingue, fr-angl-esp). *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 119-122.
- [14] PANNETIER C. and BUFFARD-MOREL J. (1982). — Production of somatic embryos from leaf tissues of Coconut, *Cocos nucifera* L., p. 755-756. In: Fujiwara A. (Ed.): *Plant Tissue Culture 1982 Proc 5th Int. Plant Tissue and Cell Culture The Japanese Association for Plant Tissue Culture*.
- [15] PANNETIER C. and BUFFARD-MOREL J. (1985). — Coconut Palm, *Cocos nucifera* L. In: Bajaj Y. P. S. (Ed.): *Biotechnology in Agriculture and Forestry I Trees I*, p. 430-450.
- [16] RABECHAUT H. and MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du Palmier à huile (*Elaeis guineensis* Jacq.) à l'aide de cultures de tissus foliaires. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 283, p. 1735-1737.
- [17] RAJU C. R., PRAKASH KUMAR P., MINI CHANDRAMOHAN and IYER R. D. (1984). — Coconut Plantlets from Leaf Tissue Cultures. *Journal of Plantation Crops*, 12, 1, p. 75-81.
- [18] SUDASRIP H., KAATH and DAVIS A. (1978). — Clonal propagation of the Coconut via the bulbils. *Philips J. coconut Stud.*, 3 (3), p. 5-14.
- [19] SCHWENDIMAN J., PANNETIER C. and MICHAUX-FERRIERE N. (1988). — Histology of somatic embryogenesis from leaf explants of the Oil Palm (*Elaeis guineensis*). *Ann. Bot.*, 62, p. 43-52.
- [20] TISSERAT B. and DE MASON D. A. (1980). — A histological study of development of adventive embryos in organ cultures of *Phoenix dactylifera* L. *Ann. Bot.*, 46, p. 465-472.

SUMMARY

Somatic embryogenesis of coconut (*Cocos nucifera* L.) from leaf and inflorescence tissue. Research, results and prospects.

J. L. VERDEIL, J. BUFFARD-MOREL, C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1989, 44, N° 8-9, p. 403-411

This article takes stock of the work carried out since 1982 by the ORSTOM-IRHO team on the somatic embryogenesis of coconut from leaf explants, and, more recently (1986), from inflorescence explants.

It is now possible to regularly obtain calluses on both types of explant. The embryogenic neoformations on calluses most often lead to incomplete or deviated embryogenesis. The main forms of deviation and the way in which they are obtained are described in terms of the two tissue origins.

A plantlet was recently obtained by somatic embryogenesis from leaf explant.

RESUMEN

Embriogénesis somática del cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de tejidos foliares y de inflorescencias. Balance de las investigaciones y perspectivas.

J. L. VERDEIL, J. BUFFARD-MOREL y C. PANNETIER, *Oléagineux*, 1989, 44, N° 8-9, p. 403-411.

Este artículo recapitula los trabajos realizados desde el año 1982 por el equipo conjunto del ORSTOM y del IRHO sobre la embriogénesis somática del cocotero a partir de explantes foliares, y más recientemente (1986) a partir de explantes de inflorescencias. La obtención regular de callos en los dos tipos de explantes se halla dominada. Las formaciones embriogénicas neoformadas en callos resultan las más veces en una embriogénesis incompleta o desviada. Las principales formas de desviación y la vía para obtenerlas se hallan descritas según los dos orígenes de tejidos. Una plántula se obtuvo hace poco por embriogénesis somática a partir de explante foliar.

Somatic embryogenesis of coconut (*Cocos nucifera* L.) from leaf and inflorescence tissue research findings and prospects

J. L. VERDEIL (1), J. BUFFARD-MOREL (1) and C. PANNETIER (2)

INTRODUCTION

With coconut (a monoecious perennial plant), conventional selection methods come up against a certain number of constraints linked to its biology: length of selection cycle (12 to 16 years), low multiplication coefficient of this palm, which is only propagated by

seeds, high heterozygosity of certain varieties giving rise to great variability in hybrid progenies.

Obtaining homogeneous material by cloning high-yielding individuals should bring about a significant increase in the productivity and homogeneity of plantations.

A few spontaneous vegetative propagation phenomena have sometimes been observed, though these are exceptional: branching, bulbils forming on inflorescences [Davis, 1969], which can sometimes root [Sudasrip *et al.*, 1978], but conventional horticultural techniques cannot be used for routine multiplication.

Tissue culture, which is very effective for cloning a large number of species [Murashige, 1974], including certain palms such as the

(1) ORSTOM/IRHO, Genetic Resources and Tropical Plant Improvement Laboratory, B.P. 5045, 34032 Montpellier Cedex

(2) INRA-CNRA, Cellular and Molecular Biology Laboratory, route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex (France)

date palm [Tisserat *et al.*, 1980] and the oil palm [Corley *et al.*, 1976; Pannetier *et al.*, 1982], is the only channel open for intensive vegetative propagation of coconut.

For more than a decade, work on somatic embryogenesis of Coconut has been conducted using tissue of different origins, such as on zygotic embryos [de Guzman *et al.*, 1971; de Guzman, 1978; Noerhadi, 1975], on roots [Fulford *et al.*, 1981], on leaf explants [Pannetier *et al.*, 1982; Gupta *et al.*, 1984] and on inflorescence explants [Eeuwens, 1976; Blake *et al.*, 1982] (Table I).

Somatic embryos usually appear after formation of a callus obtained on the initial explant (Fig. 1).

Whilst the first results were promising (embryo type formations rapidly obtained on calli), only three teams have so far succeeded in obtaining complete regeneration of plants from somatic tissue [Raju *et al.*, 1984; Branton *et al.*, 1984; Buffard *et al.*, 1988]. It would appear that the ramets obtained came from a limited number of cultures and somatic embryogenesis of the Coconut, as far as we know, has still not been properly mastered.

This article takes stock of the work done by the ORSTOM-IRHO team since 1981 using leaf explants and, more recently (1986), using inflorescence explants.

It mentions the main difficulties encountered and the methods that made it possible to improve embryoid culture quality and led to the recent obtainment of a plantlet from leaf tissues.

I. — PLANTING MATERIAL

As with the oil palm, somatic embryogenesis work on coconut began using leaf explants. In order to diversify the origins of the tissue used and acquire a better idea of the influence of the primary explants' physiological condition, a young inflorescence culturing programme has been under way for the last 3 years, in parallel with the leaf programme.

The work has basically concentrated on Malayan Yellow Dwarf × West African Tall hybrid individuals (PB 121 hybrids created by IRHO) West African Tall and Malayan Yellow Dwarf genotypes have also been worked on.

All the planting material comes from the IRHO Marc Delorme Station in Côte d'Ivoire.

For each culturing operation, leaf and inflorescence samples are currently taken at the same time (on adult trees 15-20 years old), and from the same individuals. Samples are taken without wounding the apex. Fresh growth of the selected trees is thus possible and has actually been observed.

For each individual tested, 1,200 to 2,000 leaf explants, and as many inflorescence explants, are cultured.

— Leaf explants comprise fragments (1 cm long) of young non-chlorophyllose leaves surrounded by the petiole bases of the older leaves.

— Inflorescence explants comprise rachilla fragments (1 to 1.5 mm thick) belonging to young inflorescences with an internal spathe between 10 and 40 cm long.

II. — EXPLANT PERFORMANCE AND CALLOGENESIS INDUCTION

Coconut tissue is highly sensitive to chlorinated auxins, which are essential for callus formation. This sensitivity is revealed by intense browning leading to explant necrosis at the auxin concentrations likely to induce the formation of neoformed tissue.

An initial research stage, conducted on leaf explants from young plants (2 to 5 years), then from adult trees, made it possible to solve the problem of obtaining calli, through the development of media combining activated charcoal and auxins.

A study of auxin-activated charcoal media, involving a large number of trials, subsequently led to improved callogenesis (callogenesis percentage doubled), which was a prerequisite for setting up embryogenesis induction trials.

Once calli were obtained on a regular basis, it was possible to establish a precise description of callogenesis from leaf and inflorescence tissue.

— On leaf explants.

Nodular calli are obtained on the underside of leaves (photo 1), and the time taken for them to appear is relatively long (4 to 5 months for an adult tree); they are often only isolated as from the sixth month after culturing. The slow progress of the phenomena, which seems to be characteristic of palms, is probably exacerbated in Coconut by the use of activated charcoal.

Histological studies show that callogenesis is initiated in the perivascular cells of the conducting bundles. The calli appear as well-individualized nodules, with an internal meristematic zone, surrounded by parenchymatous cells. Internal localisation of calli, as well as the way in which they develop, governed by a cambium-type meristematic area, is also observed on other palms grown *in vitro*, such as the date palm [Tisserat *et al.*, 1980] and the oil palm [Schwendiman *et al.*, 1988].

The callogenesis percentage varies according to the physiological age of the explant and significantly according to the auxin concentration of the medium. It also varies according to the age of the tree from which the sample is taken. This is how, for an auxin concentration which can fluctuate markedly depending on the sampling date, the percentage of explants bearing calli is between 60 and 70 p. 100 on trees 5 years old. It varies from 30 to 40 p. 100 on trees 15 to 20 years old.

— On inflorescence explants.

Depending on the auxin type and concentration used, two types of callus can be formed.

— calli of internal origin which form on vascular tissue and appear on the rachis cross-section (proximal pole side) (photo 2) these elongated calli have high rooting potential;

— globular white calli forming on the floral areas, with embryogenic potential (photo 3). They appear after 3 to 5 months' culturing on 45 p. 100 of the explants in the best case. They appear similar to « calloids » obtained by Branton and Blake (1984) and are derived from existing male floral meristems. They are characterized by the presence of areas of highly meristematic cells.

Reactivation of material, with respect to callogenesis, from floral areas is, under our culturing conditions, closely linked to the age of the inflorescence and its degree of differentiation. The results of these trials meant that, for later culturing, it was possible to keep inflorescences whose external spathe was between 15 and 30 cm long.

III. — EXPRESSION OF EMBRYOGENESIS POTENTIAL

After isolation of the calli obtained on explants (leaf and inflorescence), embryogenic-type structures can be obtained. They take the form of more or less individualized pearly white nodules (photo 4). They can give rise to totally meristematic globules, often covered with an epidermis; they can then be likened to proembryos.

All the trees cultured have given rise to this type of embryogenic formation, though yields remain low appearing on 10 p. 100 of the isolated calli at most.

These formations are usually observed on leaf or inflorescence calli, subcultured on media gradually reduced in auxin content. Nonetheless, they can appear from inflorescence tissue without it being necessary to transfer the original explant.

The subsequent development of these embryogenic-type formations usually poses problems. They can give rise to embryo-type structures either blocked at this stage or evolving in two ways (Fig. 2):

— multiplication and obtainment of a clump of fused « embryoids », whose development has halted;

— incomplete embryogenesis characterized by development of the haustorium and, possibly, the root.

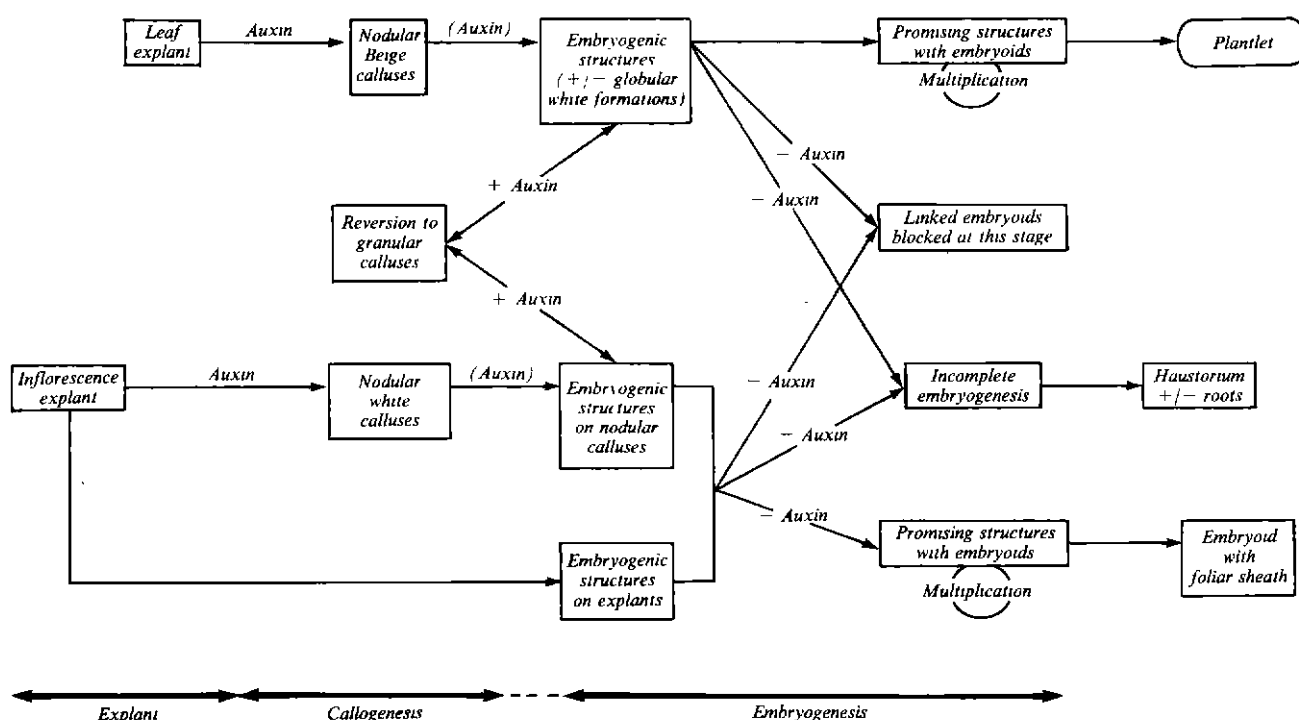
Recently, however, an embryoid was rapidly obtained from leaf explants after callus isolation; it multiplied and gave rise to a clump of well-individualized somatic embryos on the root pole (photo 5). One of them produced a shoot (photo 6). Following isolation and rooting treatment, the plantlet obtained has just been successfully acclimatized in the phytotron.

On inflorescence explants, a proliferation phenomenon has also recently been obtained on the root pole of young embryoids isolated very early on an auxin-free medium. This multiplication phenomenon has made it possible to obtain promising cultures composed of different « somatic embryos », some of which have emitted a leaf sheath (photo 7).

The importance of possible proliferation from the root pole of young embryoids needs to be emphasized:

— it is from this type of propagation that the embryo was obtained which led to the complete regeneration of a plant from leaf tissue;

— embryoid multiplication should enable mass production of ramets, even if the production of embryogenic structures is initially limited.

FIG. 2 — Overall for obtaining and development of embryogenic structures on *cocos nucifera* L.

CONCLUSION

In view of the encouraging results obtained with leaf tissue (neoformation of a plant) and with inflorescence tissue (multiplying embryo cultures obtained), trials are currently being continued and stepped up, so as to arrive at a true vegetative propagation procedure.

Success will require an understanding of the causes of blocked embryogenesis and precise knowledge of the physiology of embryogenic-type formations.

In relation to tissue evolution, we are currently conducting histochemical studies, with a view to revealing lipoprotein reserves

which could serve as early indicators of the satisfactory progress of embryogenesis (Schwendiman *et al.*, 1988). Insofar as exogenic hormones (particularly auxins) play a predominant role in the evolution of embryogenic structures, we plan *in situ* quantitative analysis of these compounds.

Conformity is of prime importance in the development of a vegetative propagation technique for Coconut. Continuing research on the two tissue origins (leaf and inflorescence) provides the possibility of a future choice of explants, depending on the conformity of the material which will be produced. In fact, the calli obtained from the two tissue types have different origins and appearances, and it is known that this stage may introduce variations according to the type of callus.